



ESTUDO DO CICLO DE VIDA MICROBIANO ATRAVÉS DA VARIAÇÃO DA UMIDADE NA TÉCNICA DE STRESS TEST.

RESUMO

O estudo do ciclo de vida microbiano pode ser determinado por diversas técnicas analíticas, cada qual com seu peculiar grau de complexidade, e tem ampla aplicação em diversos estudos científicos e usos industriais. O desenvolvimento de novas técnicas nesta área, de custo reduzido e de fácil utilização resulta diretamente na elevação da confiabilidade dos parâmetros de controle da saúde pública. No presente trabalho foi determinado graficamente o ciclo de vida microbiano, em uma biomassa genérica, composta basicamente por milho e soja, através da utilização dos resultados periódicos de umidade, obtidos em um ensaio de Stress Test. A principal vantagem do método está relacionada à simplicidade, e conseqüente acessibilidade aos mais diversos campos de pesquisa.

PALAVRAS-CHAVE: Ciclo de vida microbiano, *Stress Test*, Umidade.

1. INTRODUÇÃO

O ensaio de *stress test* (teste de estresse) objetiva a aceleração de tempo de vida de um determinado produto ou substância[1]. Na indústria alimentícia este teste é mais conhecido por *Shelf Life* e é utilizado para medir e estimar, de forma acelerada, a estabilidade de um determinado gênero alimentício sob condições que aumentam a taxa de degradação, e neste sentido, incontestavelmente, os microrganismos são os principais agentes transformadores de substâncias orgânicas[2]. Em um contexto mais amplo, este ensaio também permite estimar a eficiência bactericida de um determinado agente ou processo[3].

1.1. Microrganismos

Devido a suas reduzidas dimensões, os microrganismos são estudados como populações e não como indivíduos[4]. Uma população de microrganismos em geral é um sistema dinâmico, com células se dividindo e células morrendo o tempo todo e a representação gráfica considera a variação do número de indivíduos em um determinado período de tempo[5].

1.2. Ciclo de Vida Microbiano

O ciclo de vida dos microrganismos na degradação de compostos orgânicos pode ser classificado em etapas bem definidas (fig.1) e depende de vários fatores, sendo os mais importantes: a carga microbiana inicial e as propriedades físico-químicas da substância, como a variação do teor de umidade e pH, composições dos gases circundantes e a temperatura do ambiente[6]. A umidade, por sua vez, pode ser expressa também em termos de atividade de água (a_w), sendo está definida como a água livre ou disponível em uma fonte de energia para os processos metabólicos dos microrganismos [7].

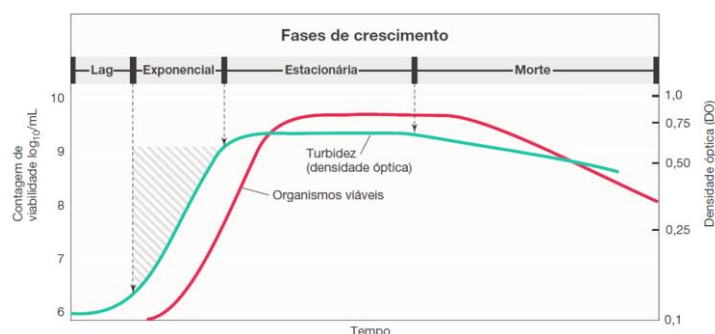


Figura 1 - Curvas de crescimento típicas de uma população bacteriana. Uma contagem de viáveis mede as células presentes na cultura capazes de se reproduzir. A densidade óptica (turbidez), uma medida quantitativa da dispersão de luz por uma cultura líquida, aumenta de acordo com o aumento do número de células[8].



Quando uma população microbiana é inoculada em um novo meio, o crescimento é iniciado somente após um período de tempo, denominado fase Lag ou fase de retardo. Esse intervalo pode ser breve ou longo, dependendo do histórico do inóculo e das condições de crescimento[9]. Se uma cultura em crescimento exponencial for transferida ao mesmo meio, nas mesmas condições de crescimento, a fase Lag não necessariamente ocorre e o crescimento exponencial começa imediatamente. Entretanto, se o inóculo for proveniente de uma cultura antiga, em geral haverá uma fase Lag, uma vez que as células encontram-se depletadas de vários constituintes essenciais, requerendo tempo para sua biossíntese[8].

As taxas de crescimento exponencial variam amplamente, sendo influenciadas pelas condições ambientais, bem como pelas características genéticas do próprio organismo. Em geral, os procaríotos crescem mais rapidamente que os microrganismos eucarióticos, e os eucariotos menores crescem mais rapidamente do que os maiores[8]. Entretanto no ambiente natural, as bactérias raramente encontram condições que permitam períodos de crescimento exponencial constantes. Em vez disso, o crescimento bacteriano é caracterizado por longos períodos de privações nutricionais pontuados por curtos períodos que permitem o crescimento rápido[10].

Quando o crescimento microbiano é limitado pela baixa concentração de nutrientes, o crescimento líquido final ou o rendimento das células aumenta a quantidade inicial do nutriente limitante presente (fig. 2a). Esta é a base de ensaios microbiológicos para vitaminas e outros fatores de crescimento. A taxa de crescimento também aumenta com a concentração de nutrientes (fig. 2b), mas de uma forma hiperbólica. A forma da curva reflete a taxa de absorção de nutrientes pelas proteínas de transporte microbiano. Em níveis de nutrientes suficientemente altos, os sistemas de transporte estão saturados, e a taxa de crescimento não sobe mais com o aumento da concentração nutrientes[11].

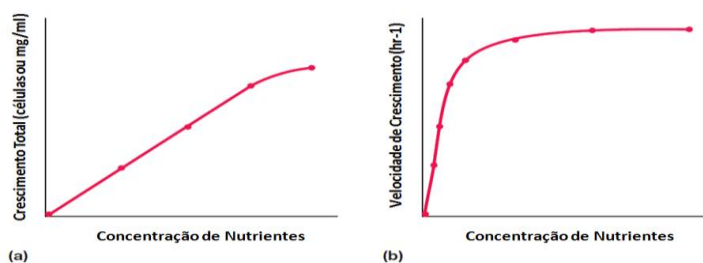


Figura 2 – Crescimento da população dos microrganismos em função substrato disponível[11].

Já na fase estacionária, não se observa aumento ou diminuição líquidos no número de células, portanto a taxa de crescimento da população corresponde a zero. Apesar da interrupção no crescimento, o metabolismo energético e os processos biossintéticos podem continuar em células na fase estacionária, mas normalmente a uma taxa muito reduzida[12]. Alguns microrganismos desenvolvem esporos assexuados como endósporos, artrósporos, esporangiosporos, conidiosporos etc. durante condições desfavoráveis, isto é, no final do crescimento exponencial, principalmente na fase estacionária.

Algumas células podem até mesmo se dividir durante a fase estacionária, porém não há aumento líquido no número de células e cedo ou tarde a população entrará na fase de morte do ciclo de crescimento celular. Todavia, normalmente a taxa de morte celular é muito mais lenta do que a taxa de crescimento exponencial, e células viáveis podem permanecer em uma cultura por dias, meses ou até mesmo anos[13].

1.3. Caracterização do ciclo de vida microbiano

O ciclo de vida de populações microbianas pode ser calculado através da contabilização do número de células ou de componentes celulares[12]. A determinação do ciclo envolve geralmente duas características celulares: o número de células e a turbidez, subdividindo-se em[8]:

- Métodos microscópicos – incluem a contagem de células presentes na cultura ou numa amostra através do microscópio ou da citometria de fluxo.
- Métodos de contagem de viáveis – apenas contabilizam células viáveis. Incluem a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de cultura.



• Métodos turbidimétricos – têm em conta o aumento dos componentes celulares como as proteínas, o DNA ou o peso seco. Essencialmente estes métodos utilizam a turbidez da cultura, ou seja, a massa celular total, extrapolando-se para o número de células.

1.4. Anomalias operacionais dos métodos mais usuais.

As contagens microscópicas diretas de amostras naturais, normalmente revelam muito mais organismos que aqueles recuperáveis em placas de qualquer meio de cultura. Assim, embora seja uma técnica de grande sensibilidade, as contagens em placa podem ser pouquíssimas confiáveis quando utilizadas na avaliação do número total de células em amostras naturais, como o solo e a água.

Já as medidas turbidimétricas podem ser por vezes muito problemáticas. Embora muitos microrganismos cresçam em suspensões homogêneas em meio líquido, outros não o fazem. Algumas bactérias formam agrupamentos pequenos ou grandes, e, nestas situações, as medidas podem ser bastante imprecisas como avaliação do total da massa microbiana. Além disso, muitas bactérias crescem em filmes sobre as paredes de tubos ou outros frascos de crescimento, mimetizando na cultura laboratorial a forma como crescem, de fato, naturalmente.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo propor uma metodologia acessível e eficaz para o estudo do ciclo de vida dos microrganismos pela variação do teor de umidade em ensaios de Stress Test.

3. MÉTODOLOGIA

Para a realização do trabalho foram utilizados substratos orgânicos compostos basicamente por milho e soja com as composições descritas na tabela 1. As amostras foram trituradas em um triturador automático da Retsch - ZM 200. Foram pesados inicialmente 100g de cada amostra e dispostas em frascos de vidro de 300 ml com tampa em duplicatas.

	A	B
MILHO	70%	50%
SOJA	30%	30%
SILAGEM (CAPIM)	0	20%

Tabela 1 – Composição das amostras utilizadas no Stress Test.

No interior do frasco de vidro também foi introduzido outro recipiente com água deionizada com o objetivo de manter a umidade ambiente em um valor alto e constante no decorrer de todo o ensaio (fig.3). O reservatório de água deionizada era continuamente reposto à medida que seu volume era reduzido em função da evaporação. Ao decorrer de todo o ensaio a umidade média apresentada no interior da câmara climática ficou em média por volta de 70% com temperatura fixa em 37°C, sendo ambos os parâmetros monitorados por um termo higrômetro da Novus - Log Box LBE.

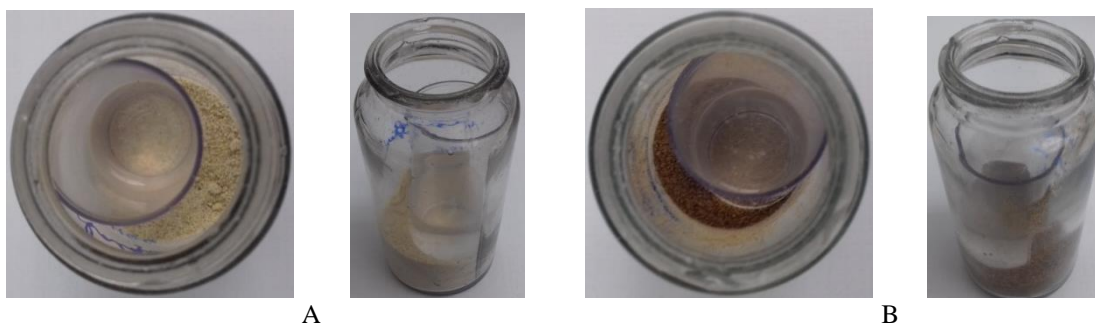


Figura 3 – Amostras utilizadas no experimento.



Para determinação da variação de umidade nas amostras, foi utilizada a metodologia proposta pela Sindirações[14], onde é retirada de uma alíquota de 3 a 5g de amostra, adicionada a um recipiente de alumínio com 5 cm de diâmetros e 4 cm de profundidade, determinada a massa inicial e a massa final após a secagem. A secagem foi realizada em uma estufa Marconi - MA 033 a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ por 3h e resfriada em um dessecador antes da pesagem em uma balança Mettler Toledo - AB 204. Desta forma a umidade das amostras pôde ser determinada através da equação 1:

$$\text{Umidade (g/Kg)} = \frac{(M_a - M_b)}{M_c} \cdot 1000$$

Onde:

M_a = Massa do recipiente + amostra antes da secagem, em g.

M_b = Massa do recipiente + amostra após a secagem, em g.

M_c = Massa da amostra, em g.

Todo experimento foi realizado em uma câmara climática Marconi - MA 035 com renovação de ar, a uma temperatura constante de 37°C , sendo periodicamente retirada uma alíquota de 3,0g das amostras para determinação da umidade por diferença de massa. O tempo experimento evoluiu ao longo de 15 dias contínuos, limitado pela quantidade de amostra inicial.

Também foram realizadas determinações bacteriológicas e de atividade da água no início e no final do experimento. Para determinação da atividade de água foi utilizado o aparelho ETEC - A_w 43, enquanto que as determinações microbiológicas seguiram os critérios e os meios de culturas propostos pelo SMEWW[15] (tab.2).

	PCA	ENTEROBACTERIAS	BOLORES E LEVEDURAS
MEIOS DE CULTURA	Plate Count Agar	Violet Red Bile Glucose Agar	Potato Dextrose Agar

Tabela 2 – Metodologia dos ensaios microbiológicos.

Para a obtenção das micrografias foi utilizado um microscópio óptico da Motic - BA 410 com resolução de até 1000 vezes. A preparação das lamínas para obtenção das imagens seguiram a metodologia proposta pela manual de detecção e identificação de fungos da ANVISA[16].

4. RESULTADOS OBTIDOS

4.1. Ensaios Microbiológicos

Os ensaios microbiológicos apresentaram resultado positivo para diversas culturas microbianas, como pode ser observado pela tabela 3. Isto já era esperado, visto a impossibilidade de esterilidade em gêneros alimentícios desta espécie. Isto pode ser resultado de diversas formas de contaminações, como: manipulação, estocagem ou mesmo ocorrências naturais.

AMOSTRAS	PCA	ENTEROBACTERIAS	BOLORES E LEVEDURAS	A_w
A	$3 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^2$	0,645
B	$4 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^2$	0,770

Tabela 3 – Resultados microbiológicos obtidos antes do ensaio de Stress Test.

Os resultados de atividade de água obtidos, inicialmente apresentaram uma tendência para o desenvolvimento de microrganismos, sutilmente superior na amostra B. Isto esta em coerência com os resultados microbiológicos e pode ser justificado pela presença de silagem (capim), visto que este substrato possui naturalmente mais água agregada a sua composição.

Após a realização do Stress Test também foram realizados ensaios de PCA e Enterobacterias. Não ocorreu aumento significativo na contagem de Enterobacterias, em ambas as amostras, na realidade ocorreu até certa



diminuição na amostra A. Entretanto as contagens de PCA, em ambas as amostras apresentaram um aumento de algumas ordens de grandeza, o que corrobora com o a contagem de fungos a bolores obtida.

AMOSTRAS	PCA	ENTEROBACTERIAS	BOLORES E LEVEDURAS
A	$3 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^3$
B	$5 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$

Figura 4 - Resultados microbiológicos obtidos após do ensaio de Stress Test.

Pelas imagens obtidas por microscopia óptica, em ambas as amostras, é possível visualizar diversas estruturas características de fungos. É possível também, entre outras coisas, a fase de proliferação dos artroconídios e a germinação dos conídiosporos.

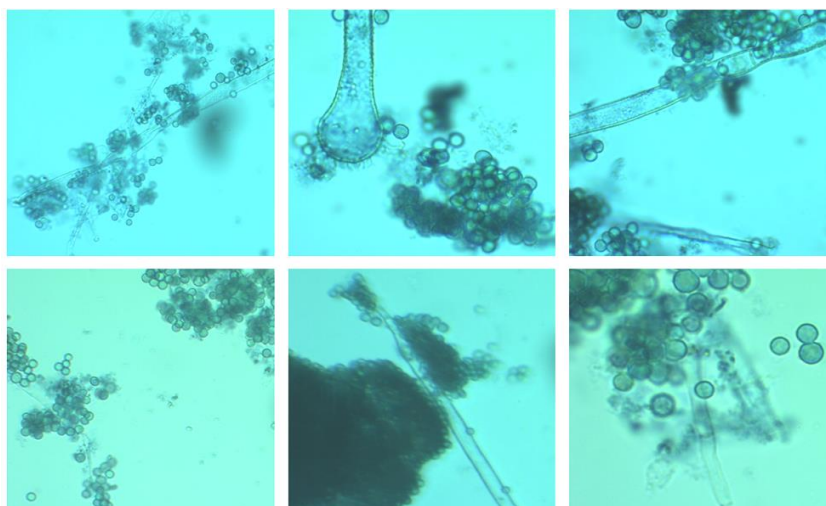


Figura 5 – Estruturas microbiológicas identificados nas amostras após 15 dias de ensaios.

4.2. Gráficos do Ciclo de Vida Microbiano

Todos os gráficos foram obtidos através da variação da umidade em função do tempo e nos forneceram uma ampla gama de informações a respeito do ciclo de vida dos microrganismos. Nos gráficos referentes as duplicatas da amostra A, (fig. 6a e 6c) podemos confirmar a reprodutibilidade do ensaio. Na amostra B (6b) percebemos um comportamento diferenciado devido a sua diferente composição. O gráfico 6d apresenta a evolução da umidade em função do tempo para as mesmas amostras em temperatura e umidade ambiente.

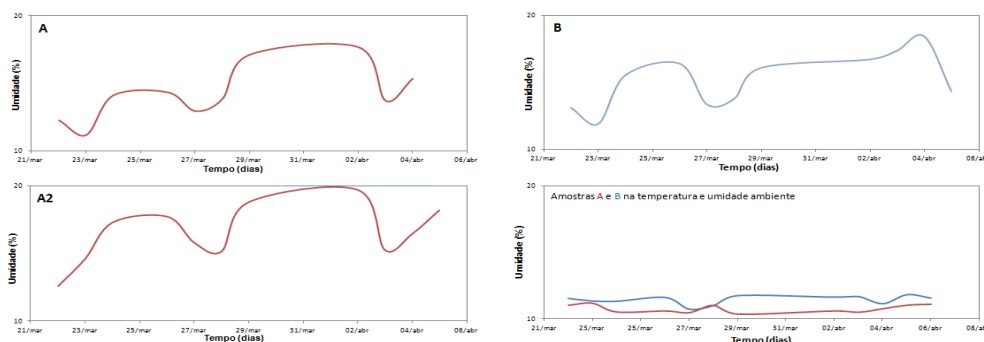


Figura 6 – Gráficos do ciclo de vida microbiano.

4.3. Interpretação dos Gráficos

Pela figura 5 podemos inicialmente identificar todas as etapas do ciclo de vida microbiano (1). Na primeira fase LAG é perceptível que foi mais breve que o usual, possivelmente por se tratar de uma continuidade, iniciada anteriormente ao início da coleta de dados dos ensaios. A elevada inclinação da curva de crescimento



indica que a proliferação de organismos foi acentuada, atingindo rapidamente a fase estacionária que se prolongou por aproximadamente dois dias. A fase de morte dos microrganismos foi mais lenta como o proposto pela literatura e ao seu fim é possível observar que o próximo ciclo se inicia em um patamar mais elevado (2) e isto é justificado pela produção de mais organismos antes da finalização da fase de morte[4].

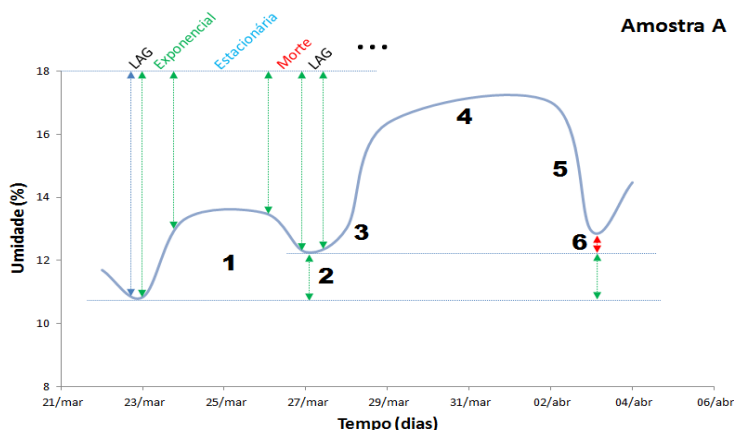


Figura 7 – Gráficos do ciclo de vida de vida dos microrganismos obtidos através da variação da umidade em função do tempo na amostra A.

No início do novo ciclo de vida é perceptível que a segunda fase LAG se prolonga por um período mais longo e que a taxa de crescimento inicialmente não é tão intensa quanto na primeira fase, ambas as ocorrências podem ser justificadas pela necessidade de adaptação da nova geração de microrganismos, considerando também que continuamente estão sendo liberadas novas substâncias sobre o substrato em função da morte dos microrganismos da geração passada. Conseqüentemente isto favorece a segunda fase estacionária que se prolonga por um período maior, visto que entre estas substâncias liberadas existem novas fontes de energia e nutrientes proporcionando mais estabilidade neste período[11]. Porém, como o crescimento é grande a morte também será grande, e a curva de morte (5) muito maior e mais intensa do que na primeira fase. No início do novo ciclo podemos perceber a elevação do patamar na terceira fase LAG, porém muito inferior as etapas anteriores indicando uma diminuição na renovação das células microbianas em função da estagnação do meio.

O gráfico da amostra B apresentou um comportamento diferenciado em função da sua composição, o que já havia se refletido nas contagens microbiológicas. Pelo gráfico podemos observar, entre outras coisas, que a fase estacionária da segunda geração (2) iniciou em um patamar inferior ao apresentado pela amostra A, indicando possivelmente uma estagnação dos nutrientes, entretanto as reservas energéticas supriram a demanda por considerável período (3) e que novas fontes de nutriente possibilitaram um breve crescimento da população microbiana sob a fase estacionária.

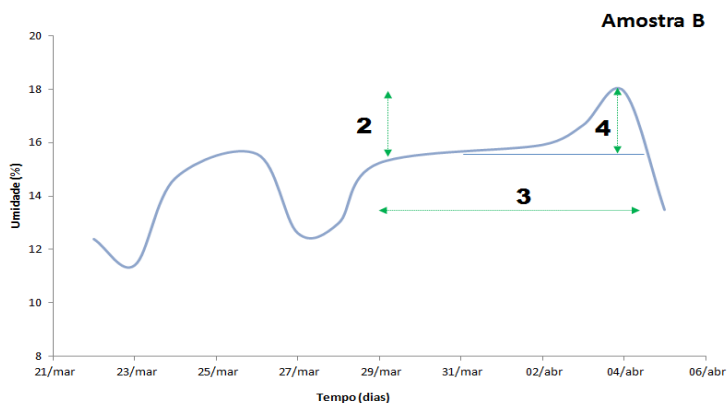


Figura 8 – Ciclo de vida microbiano na amostra B.



5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram a simplicidade para a obtenção de informações importantes sobre o ciclo de vida microbiano pela metodologia proposta. Muitas destas informações demandariam de equipamentos sofisticados com diversas etapas e limitados a poucas gerações de microrganismos, além de apresentarem um grau de reprodutibilidade e confiabilidade pouco significativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. TEOH, “Predicting the stability of natural colours in food products, A review,” *AgroFOOD Industry hitech*, pp. 20-23, 2010.
- [2] M. C. NICOLI, “Shelf Life Assessment of Food,” em *Shelf Life Assessment of Food*, Boca Raton, CRC Press, 2012, pp. 1-3.
- [3] S. WALKER, “The principles and practice of shelf life prediction for microorganisms,” em *SHELF LIFE EVALUATION OF FOODS*, London, Springer Science+Business Media Dordrecht, 1994, pp. 40-41.
- [4] H. A. VIDELA, *Biocorrosão, Biofouling e Biodegradação de Materiais*, São Paulo: Edgard Blucher, 2003.
- [5] C. L. PETRAROLHA, *Crescimento Bacteriano*, Andradina, São Paulo: FISMA-FCCA, 2015.
- [6] KREYENCHIMIDT, J.; IBALD, R., “Modeling Shelf Life Using Microbial Indicators,” em *Shelf Life*, Boca Raton, CRC Press, 2012, pp. 127-128.
- [7] O. FENNEMA, *Food Chemistry*, New York: Marcel Dekker Inc, 1996, pp. 17-94.
- [8] MADIGAN, I; MICHAEL T., *Microbiologia de Brock*, Porto Alegre: Artmed, 2016.
- [9] R. M. MAIER, “Bacterial Growth,” em *Environmental Microbiology*, NEW YORK, Elsevier Inc., 2009, p. 38.
- [10] KOLTER, R.; SIEGELE, D.A.; TORMO, U., “The stationary phase of the bacterial life cycle,” *Annu Rev Microbiol.*, 1993.
- [11] WILLEY, J. M.; SHERWOOD, L. D.; WOOLVERTON, C. J., *Microbiology*, New York: McGraw-Hill, 2008.
- [12] TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F., *Microbiologia*, São Paulo: Atheneu, 2005.
- [13] WERKMAN, C. H.; WILSON, P. W., *Bacterial Physiology*, NEW YORK : ACADEMIC PRESS INC. - PUBLISHERS , 1951.
- [14] SINDIRAÇÕES, “Métodos 53 - Umidade e Voláteis por Estufa,” em *Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal*, São Paulo, 2017.
- [15] APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, WASHINGTON: American Public Health Association, 2017.
- [16] ANVISA, *Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica - Módulo VII*, São Paulo: ANVISA, 2004.